

Opracowanie testu PCR do wykrywania genu kodującego dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* w wymazach z nosa świń^{*)}

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ARTUR JABŁOŃSKI, AGNIESZKA NOWAK,
KATARZYNA STĘPNIEWSKA, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Jabłoński A., Nowak A., Stępniewska K., Pejsak Z.

Elaboration of a PCR test for the detection of *Past. multocida* dermonecrotogenic strains in nasal swabs of pigs

Summary

Atrophic rhinitis is a disease of high economic impact for pig production, caused by *Pasteurella multocida* (*P.m.*) strains able to produce dermonecrotxin (DNT). In general the diagnosis of pigs' infection with *P.m.* is based on the direct detection of bacteria from nasal swabs and their identification as well as on the detection of DNT specific antibodies by using an ELISA test. The aim of the study was the elaboration of a PCR test for the detection of dermonecrotic strains of *P.m.* directly in nasal swabs. The optimization of the process includes: estimation of Mg^{2+} concentration, the temperature of primer hybridization and the number of cycles. The specificity and sensitivity of the test was estimated for both bacterial culture and nasal swabs. The optimal conditions were as follow: Mg^{2+} concentration – 2.5 m M/reaction; the temperature of primers hybridization – 56°C; and the number of cycles – 50. The sensitivity of the test for both the culture and nasal swabs was 2.5×10^3 cfu/ml. The test was also highly specific – the product of 501 bp was detected only in the samples containing DNA of *P.m.* Summarizing, the elaborated test was specific and sensitive enough to be used for routine detection of *P.m.* DNT strains in clinical samples and for the elimination of the carriers from the herd.

Keywords: *Pasteurella multocida*, diagnosis, PCR

Zakaźne zanikowe zapalenie nosa świń (zzzn) jest chorobą o istotnym znaczeniu dla efektywnej produkcji trzody chlewnej, wywoływaną przez szczepy *Pasteurella multocida* (*P.m.*) zdolne do wytwarzania dermonekrotoksyny (DNT) (17). Zakażenia świń szczepami *P.m.* DNT, z uwagi na prowadzoną immuno- i chemioprophylaktykę, mogą występować w formie podklinicznej lub nawet bezobjawowego nosicielstwa (12). Uzasadnia to skrupulatne badania laboratoryjne ukierunkowane na wykrywanie obecności lub braku wymienionego drobnoustroju, szczególnie u zwierząt nowo wprowadzanych do stad (7, 8).

Metody stosowane w diagnostyce laboratoryjnej zmieniły się wraz z rozwojem technik badawczych i dostępnością aparatury. Obecnie w większości laboratoriów badania ukierunkowane na wykrywanie czynników chorobotwórczych odpowiedzialnych za wywoływanie poszczególnych jednostek chorobowych zwierząt prowadzone są z wykorzystaniem osiągnięć biologii molekularnej (5, 8).

Dotychczasowa diagnostyka zakażeń świń *P.m.* opierała się na bezpośredniej izolacji drobnoustrojów z wy-

mazów z nosa i ich identyfikacji (4, 13, 15). Pomimo że metoda ta posiada szereg ograniczeń (jest czasochłonna, a jej wynik jest uzależniony od wielu czynników, w tym m.in. czasu, jaki upłynął od pobrania materiału do rozpoczęcia badania i warunków jego transportu) jest ona uznawana za tzw. złoty standard. Powszechnie stosowaną pośrednią metodą diagnostyczną było również wykrywanie swoistych dla *P.m.* DNT przeciwciał w surowicy świń z wykorzystaniem immunoenzymatycznego testu ELISA (6, 19).

Celem badań było opracowanie testu PCR do wykrywania *P.m.* DNT bezpośrednio w materiale klinicznym, który charakteryzowałby się wysoką powtarzalnością, czułością, swoistością, jednoznacznością wyniku i łatwością jego interpretacji. Gen kodujący dermonekrotoksynę *P.m.* jest uważany za specyficzny dla tego gatunku bakterii oraz charakterystyczny dla patogennych szczepów *P.m.* wywołujących objawy chorobowe u świń (3, 10, 16). W krajowych laboratoriach weterynaryjnych dotychczas nie prowadzi się rutynowych badań rozpoznawczych w kierunku *P.m.* DNT przy użyciu testu PCR.

^{*)} Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2010, jako projekt badawczy nr N308322833.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do optymalizacji warunków reakcji amplifikacji genu kodującego *P.m.* DNT oraz oceny czułości i specyficzności testu PCR użyto referencyjnego szczepu P958 *P.m.* namnożonego na agarze z dodatkiem 5% krwi końskiej, przez 24 godziny, w 37°C, w warunkach tlenowych. W celu uzyskania jednorodnego materiału wyjściowego sporządzono zawiesinę z wyhodowanych kolonii szczepu P958, o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Do określenia czułości reakcji wykonano następnie szereg dziesiętnych rozcieńczeń zawiesiny.

Ponadto do kontroli specyficzności testu wykorzystano materiał genetyczny drobnoustrojów, które potencjalnie mogą się znajdować w jamie nosowej i układzie oddechowym świni. Ich wykaz oraz źródło pochodzenia przedstawiono w tab. 1.

Ekstrakcja DNA. Do ekstrakcji bakteryjnego DNA wykorzystano zestaw Genomic DNA Prep Plus – izolacja z czystej kultury bakteryjnej (A&A Biotechnology, Gdańsk). Pobrano po 100 µl każdego rozcieńczenia zawiesiny szczepu P958 *P.m.* i dalej postępowano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta zestawu. Uzyskane DNA wykorzystywano bezpośrednio do reakcji PCR lub przechowywano w –80°C do dalszych badań.

Optymalizacja warunków amplifikacji. Proces optymalizacji rozpoczęto od określenia stężenia jonów magnezowych (Mg²⁺). Optymalną wartość stężenia Mg²⁺ wyznaczono przeprowadzając szereg reakcji PCR, w których używano od 2,5 mM do 3,5 mM Mg²⁺.

Następnie optymalizowano temperaturę przyłączania starterów, stosując następujące warunki: 53°C, 56°C i 60°C.

Kolejno ustalono liczbę cykli, która determinowała osiągnięcie optymalnej wydajności reakcji amplifikacji. Amplifikację DNA przeprowadzano w 30, 40 i 50 cyklach.

Startery do reakcji PCR. Do amplifikacji fragmentu genu *toxA* kodującego *P.m.* DNT, wykorzystano parę starterów *toxA6/toxA7*, których sekwencja została opublikowana przez

Register i wsp. (tab. 2). Amplifikowano fragment o długości 501 pz.

Amplifikację przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 2,5 mM MgCl₂, dNTP (mix o koncentracji 10 mM), bufor enzymatyczny, 5 U termostabilnej polimerazy Taq (Gold Polymerase, Roche), startery w stężeniach 20 pM/reakcję, matrycowy DNA (2,5 µl) oraz wodę do końcowej objętości 25 µl.

Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Biometra PTC-100 (MJ Research INC, USA) używając programu o następujących parametrach: 95°C 10 min. (denaturacja wstępna), a następnie 95°C – 30 sek., 56°C – 30 sek., 72°C – 30 sek. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w 72°C przez 10 minut.

Otrzymany produkt amplifikacji identyfikowano w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny o stężeniu 1 µl/ml. Elektroforezę przeprowadzano przez około 35 minut w buforze 1xTAE (40 mM Tris, kwas octowy, 0,1 mM EDTA), przy stałym napięciu i natężeniu równym 350 mA. Wielkość produktu oceniano przez porównanie go z markerem masy molekularnej GeneRuler™100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Po standaryzacji testu PCR oraz określeniu jego czułości i specyficzności w czystej kulturze bakteryjnej przystąpiono do ustalenia warunków reakcji w odniesieniu do materiału klinicznego (wymazy z nosa). Z powodu braku zwierząt SPF materiał w postaci wymazów pobierano z jam nosowych świń pochodzących ze stada o wysokim statusie zdrowotnym, uprzednio poddanych chemioprophylaktyce. Badania przeprowadzono na wyosobnionej w izolatorium grupie 10 tuczników o masie ciała 70-90 kg, nie poddanych immunizacji przeciwko zzzn. W czasie poprzedzającym pobranie wymazów przez dwa tygodnie zwierzętom podawano oksytetracyklinę (Tetradur), w dawce 80 mg/kg *i.m.*, w odstępach 4-dniowych. W okresie podawania antybiotyku przeprowadzono dwukrotne badanie kontrolne w kierunku obecności *P.m.* klasyczną metodą bakteriologiczną. Po uzyskaniu wyników negatywnych i tuż po zakończeniu podawania antybiotyku od wymienionych zwierząt pobrano 20 wymazów z nosa, których użyto do określania czułości opracowywanej metody.

W celu otrzymania materiału do ekstrakcji wymazy z nosa pobrane od tuczników zanurzano w 1 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej, próbówkę intensywnie wytrząsano, a następnie pobierano 500 µl jednorodnej zawiesiny i wirowano (13 000 obrotów, 5 minut, temperatura otoczenia). Supernatant zlewano, a uzyskany na dnie osad inokulowano dziesiętnymi rozcieńczeniami szczepu P958, po 100 µl. Całkowite DNA ekstrahowano przy użyciu tego samego zestawu, co w przypadku czystej kultury bakteryjnej, ale stosując protokół do izolacji z tkanek. Różnił się on od poprzedniego czasem inkubacji (w odniesieniu do bakterii stosowano 20 minut, a w przypadku tkanki 1 godzinę) i temperaturą trawienia (dla bakterii stosowano 37°C, a dla tkanki 50°C).

Oczyszczone DNA poddawano bezpośrednio reakcji amplifikacji lub zamrażano w –80°C do czasu dalszych analiz. Warunki reakcji były analogiczne jak w przypadku testu PCR z DNA uzyskanym z czystej kultury bakteryjnej.

Po optymalizacji warunków testu do wykrywania *P.m.* DNT w wymazach z nosa zdrowych tuczników, inokulowanych w warunkach doświadczalnych szczepem referencyjnym P958 *P.m.*, zastosowano test do rutynowych badań diagnostycznych w kierunku zzzn prowadzonych w Zakładzie Chorób Świń PIWet-PIB w Puławach (wyniki tych badań zostaną przedstawione w odrębnej pracy).

Tab. 1. Wykaz szczepów bakteryjnych wykorzystanych w badaniach

Gatunek	Nazwa szczepu	Pochodzenie
<i>Pasteurella multocida</i> (DNT)	P958	Szczep szczepionkowy biopreparatu Rhinovac
<i>Pasteurella multocida</i>	P347	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3/34/02 B.br.	Izolat DTU Kopenhaga
<i>Haemophilus parasuis</i>	Hps ref. 5	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	App ref 9	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy
<i>Actinobacillus indolicus</i>	2/65/98 A.i	Izolat DTU Kopenhaga
<i>Actinobacillus porcinius</i>	2/35/04 A.p	Izolat DTU Kopenhaga
<i>Actinobacillus minor</i>	2/43/01 A.m	Izolat DTU Kopenhaga
<i>Streptococcus suis</i> II	S1043	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	A143	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	SCh23	Izolat własny, PIWet-PIB Puławy

Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych w teście PCR

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Amplifikowany gen	Amplikon PCR (pz)	Piśmiennictwo
<i>toxA_6</i>	TGCTCAAATCCTAAATCACCTTGT	<i>toxA</i>	501	(7)
<i>toxA_7</i>	ACTACAGATTCTAACAAGGTTCTGG			

Wyniki i omówienie

Zastosowane w badaniu sekwencje starterów, przedstawione w tabeli 2, charakteryzowały się konserwatywnością i wykazywały wysoką homologię do matrycy, co eliminowało ryzyko otrzymania wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych. Przeprowadzona analiza wykazała, że wybrane startery amplifikowały jedynie specyficzne fragmenty DNA *P.m.* DNT, co potwierdziło opisaną przez innych autorów wysoką swoistość gatunkową tych oligonukleotydów (10, 18, 21).

W czasie optymalizacji reakcji PCR stwierdzono, że najkorzystniejsze stężenie jonów magnezowych wynosi 2,5 mM/reakcję (ryc. 1), optymalna temperatura przyłączania starterów wynosi 56°C (ryc. 2), a liczba cykli potrzebna do wydajnej amplifikacji DNA wynosi 50 (ryc. 3).

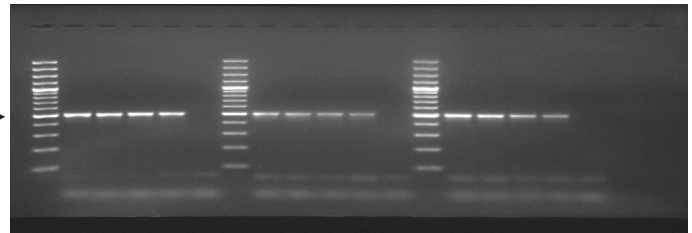
W kolejnym etapie doświadczenia określono czułość reakcji PCR. Oznaczenie czułości możliwe było na podstawie określenia minimalnej liczby komórek bakteryjnych, która była wystarczająca do przeprowadzenia reakcji amplifikacji. Badając szereg rozcieńczeń hodowli *P.m.* o wyjściowej koncentracji $2,5 \times 10^8$ jednostek tworzących kolonie/ml (j.t.k./ml) wykazano, że reakcja jednoetapowa pozwoliła na wykrycie $2,5 \times 10^3$ j.t.k./ml (ryc. 4). Uzyskane wyniki są zbliżone do opisanych przez innych autorów. Dla przykładu, Lichtensteiger i wsp. (14), analizując kolejne rozcieńczenia hodowli *P.m.* ustalili, że czułość reakcji kształtowała się na poziomie kilkuset komórek.

Czułość reakcji PCR określona w warunkach eksperymentalnych, na podstawie badania oczyszczonego DNA uzyskanego z namnożonych kultur bakteryjnych, może odbiegać od czułości osiąganej w przypadku analizy materiału biologicznego, co wynika głównie ze złożoności chemicznej próbek klinicznych i występowania w nich wielu niezidentyfikowanych substancji, które mogą hamować amplifikację.

Analiza porównawcza wyników uzyskanych w badaniach własnych wykazała, że czułość opracowanej metody wykrywania materiału genetycznego *P.m.* DNT w próbkach klinicznych kształtowała się na takim samym poziomie, jak w przypadku rozcieńczeń dziesiętnych czystej kultury bakteryjnej (ryc. 5). Z uwagi na fakt, że *P.m.* DNT występują w zatokach nosowych w dużo większej liczbie niż w dalszych odcinkach dróg oddechowych, osiągnięta czułość metody jest wystarczająca do wykrywania obecności bakterii bezpośrednio w wymazach z nosa (1, 2). Na podkreślenie zasługuje fakt, że pomimo zanieczyszczenia wymazów innymi drobnoustrojami bytującymi w jamie nosowej czułość opracowanej metody nie zmniejszyła się po jej zastosowaniu do rutynowego badania materiału klinicznego. Wskazuje to, że uzyskane wyniki badań własnych poszerzają osiągnięcia Register i wsp. (18), którzy zastosowali opisaną metodę jedynie w odniesieniu do czystej kultury bakteryjnej, bez możliwości wykrywania DNA bakterii w zanieczyszczonym materiale klinicznym, jaki stanowią wymazy z nosa.

Ze względu na fakt, że startery wykorzystywane w badaniach syntetyzowano na podstawie piśmiennictwa, niezbędne było określenie ich swoistości, zarówno w odniesieniu do szczepu referencyjnego P958, jak i w stosunku do izolatów terenowych innych gatunków drobnoustrojów, które potencjalnie występują w jamach nosowych

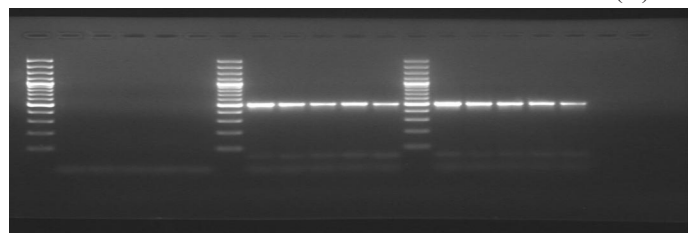
M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 K(m)



Ryc. 1. Wpływ stężenia Mg^{2+} na czułość i swoistość jednoetapowej metody PCR do wykrywania genu *toxA* *Pasteurella multocida*

Objaśnienia: M – wzorec masy molekularnej; 1-5 – dziesiętne rozcieńczenia *P.m.* przy stężeniu Mg^{2+} 2 mM; 6-10 – dziesiętne rozcieńczenia *P.m.* przy stężeniu Mg^{2+} 2,5 mM; 11-14 – dziesiętne rozcieńczenia *P.m.* przy stężeniu Mg^{2+} 3,0 mM; K(m) – kontrola mieszaniny reakcyjnej

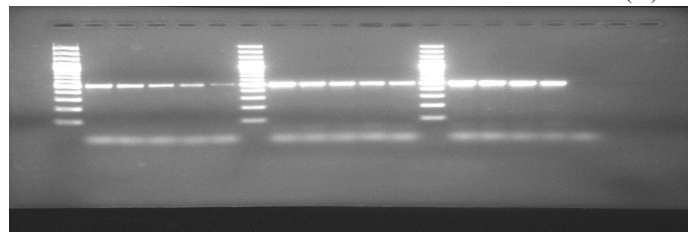
M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 K(m)



Ryc. 2. Wpływ temperatury hybrydyzacji starterów na czułość i swoistość jednoetapowej metody PCR do wykrywania genu *toxA* *Pasteurella multocida*

Objaśnienia: M (j.w.); 1-5 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* przy temperaturze hybrydyzacji 53°C; 6-10 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* przy temperaturze hybrydyzacji 56°C; 11-15 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* przy temperaturze hybrydyzacji 60°C; K(m) (j.w.)

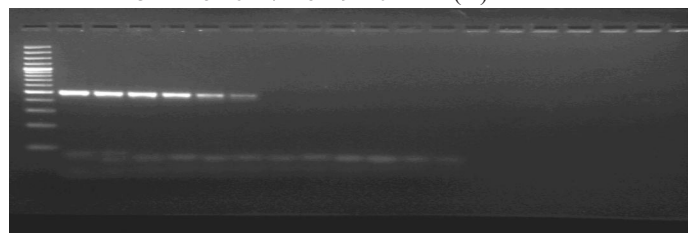
M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 K(m)



Ryc. 3. Wpływ liczby cykli na czułość i specyficzność metody PCR do wykrywania genu *toxA* *Pasteurella multocida*

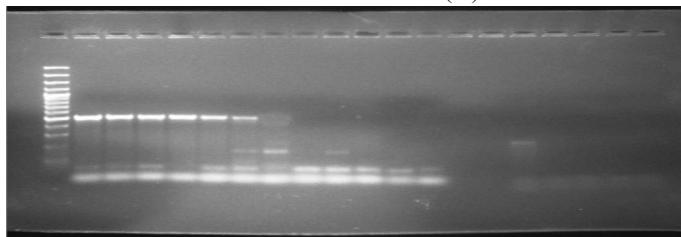
Objaśnienia: M (j.w.); 1-5 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* po 30 cyklach; 6-10 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* po 40 cyklach; 11-15 – rozcieńczenia dziesiętne *P.m.* po 50 cyklach; K(m) (j.w.)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 K(m)



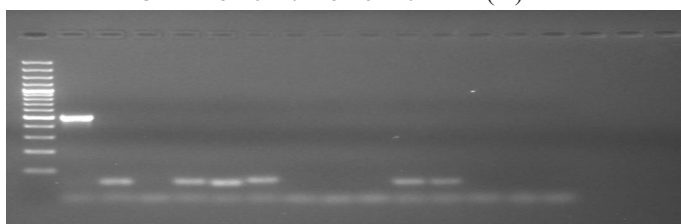
Ryc. 4. Czułość jednoetapowej reakcji PCR do wykrywania genu *toxA* *Pasteurella multocida* w czystej hodowli bakteryjnej szczepu P958 *P.m.* zawieszony w roztworze fizjologicznym o wyjściowej koncentracji $2,5 \times 10^8$ j.t.k./ml
Objaśnienia: M (j.w.); 1-11 – rozcieńczenia dziesiętne *Pasteurella multocida* (10^0 - 10^{-10}); K(m) (j.w.)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 K(m)



Ryc. 5. Czulość jednoetapowej reakcji PCR do wykrywania genu *toxA Pasteurella multocida* w wymazach z nosa świń inokulowanych dziesiętnymi rozcieńczeniami szczepu P958 *P.m.* Objasnienia: M (jw.); 1-11 – wymazy inokulowane dziesiętnymi rozcieńczeniami P958; K(m): (jw.)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 K(m)



Ryc. 6. Swoistość jednoetapowej reakcji PCR do wykrywania genu *toxA Pasteurella multocida*

Objasnienia: M (jw.); 1 – kontrola dodatnia szczepu P958 *P.m.*; 2 – szczep P347 *P.m.*; 3 – *Bordetella bronchiseptica*; 4 – *Haemophilus parasuis*; 5 – *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 6 – *Actinobacillus indolicus*; 7 – *Actinobacillus porcinius*; 8 – *Actinobacillus minor*; 9 – *Streptococcus suis*; 10 – *Arcanobacterium pyogenes*; 11 – *Salmonella Choleraesuis*; K(m) (jw.)

i układzie oddechowym świni. W wykonanych badaniach oczekiwany produkt wielkości 501 pz otrzymano tylko w próbkach, w których użyto DNA szczepu P958, co potwierdza swoistość opracowanego testu (ryc. 5).

Reakcja polimeryzacji łańcuchowej jest szeroko stosowana do szybkiego wykrywania materiału genetycznego patogenów, szczególnie takich, których hodowla *in vitro* jest długotrwała lub trudna (11, 20). Identyfikacja drobnoustrojów przy użyciu tej metody nie wymaga dostępu do materiału świeżo pobranego, całych nieuszkodzonych komórki bakterii, a jedynie do ich materiału genetycznego. Istotną zaletą testów diagnostycznych opartych na PCR jest także wysoka ich czulość, pozwalająca uzyskać pozytywny wynik w przypadku obecności teoretycznie nawet jednej kopii DNA lub nawet fragmentu genu. Eliminuje to czasochłonny etap konwencjonalnej diagnostyki mikrobiologicznej, tzn. inkubację drobnoustrojów *in vitro* na podłożach bakteriologicznych i ich identyfikację fenotypową z wykorzystaniem różnych metod (15).

Jak wspomniano we wstępie, alternatywny sposób wykrywania zakażeń stad świń *P.m.*, polegający na detekcji antygenu *P.m.* testem immunoenzymatycznym, nie pozwala na rozróżnienie izolatów *P.m.* DNT(+) od *P.m.* DNT(-), stąd jego przydatność w rozpoznawaniu zzzn jest ograniczona. Z kolei badaniem serologicznym przy użyciu testu ELISA przeznaczonego do wykrywania przeciwciał dla *P.m.* DNT nie można rozróżnić przeciwciał anty-DNT *Pm*, które są efektem szczepienia profilaktycznego od przeciwciał, które powstały w wyniku stymulacji układu immunologicznego przez drobnoustrój (w toku zaka-

żenia), dlatego nie powinien być on stosowany do oceny stanu zdrowia świń wprowadzanych do stad wolnych od tej choroby (8, 19). Z wymienionych powodów opracowany test PCR wydaje się mieć szerokie zastosowanie praktyczne w diagnostyce zzzn.

Podsumowując, w pracy przedstawiono optymalizację oraz ocenę czulości i swoistości testu PCR do wykrywania *P.m.* DNT zarówno w czystej kulturze bakteryjnej, jak i w materiale klinicznym. Uzyskane wyniki charakteryzują się wystarczającą czulością i specyficznością, w związku z tym opracowany test może być wykorzystywany do rutynowego wykrywania szczepów *P.m.* DNT oraz stanowić podstawę eliminacji bezobjawowego nosicielstwa omawianych patogenów ze stad świń.

Piśmiennictwo

- Ackermann M. R., Chevillat N. F., Gallagher J. E.: Colonization of the pharyngeal tonsil and respiratory tract of the gnotobiotic pig by a toxigenic strain of *Pasteurella multocida* type D. *Vet. Pathol.* 1991, 28, 267-274.
- Ackermann M. R., Debey M. C., Register K. B., Larson D. J., Kinyon J. M.: Tonsil and turbinate colonization by toxigenic and nontoxigenic strains of *Pasteurella multocida* in conventionally raised swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 375-377.
- Amigot J. A., Torremorell M., Pijoan C.: Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998, 10, 169-173.
- Anon.: Atrophic rhinitis of swine, [w:] OIE Terrestrial Manual. Paryż, Francja 2008, 1083-1091.
- Antony P. X., Nair G. K., Jayaprakasan V., Mini M., Aravindakshan T. V.: Nucleic acid based differentiation of *Pasteurella multocida* serotypes. *J. Vet. Med.* 2007, 2, 2-5.
- Bowersock T. L., Hooper T., Pottenger R.: Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 419-422.
- Choi C., Chae C.: Enhanced detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs using a nested polymerase chain reaction. *Vet. J.* 2001, 162, 255-258.
- Hozbor D., Fouque F., Guiso N.: Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 1999, 150, 333-341.
- Jong-de M. F.: Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis, [w:] Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J.: Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA 2006, s. 577-602.
- Kamp E. M., Bokken G. C. A., Vermeulen T. M. M., de Jong M. F., Buys H. E., Reek F. H., Smits M. A.: A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *P. multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996, 8, 304-309.
- Kamp E. M., Ter Laak E. A., de Jong M. F.: Atypical *Pasteurella* strains producing a toxin similar to the demonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. *Vet. Rec.* 1990, 126, 434-437.
- Kavanagh N. T.: Isolation of toxigenic *P. multocida* type D from pigs in a herd free from progressive rhinitis in Ireland. *Mat. Kongresu IPVS, Bangkok* 1994, s. 121.
- Lariviere S., Leblanc L., Mittal K. R., Martineau G. P.: Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1398-1401.
- Lichtensteiger C. A., Steenbergen S. M., Lee R. M., Polson D. D., Vimr E. R.: Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 3035-3039.
- Markowska-Daniel I., Samorek M., Stepińska K.: Rozpoznawanie, profilaktyka i leczenie progresywnego zakaźnego zanikowego zapalenia nosa świń. *Lecznica Dużych zwierząt* 2008, 2, 18-25.
- Nagai S., Someno S., Yagihashi T.: Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *P. multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1004-1010.
- Pejsak Z.: Zakaźne zanikowe zapalenie nosa, [w:] Ochrona zdrowia świń. PWR, Poznań 2007, 289-295.
- Register K. B., DeJong K.: Analytical verification of a multiplex PCR *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.* 2006, 117, 201-210.
- Takada-Iwao A., Uto T., Mukai T., Okada M.: Evaluation of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of antibodies against *Pasteurella multocida* toxin. *J. Vet. Med. Sci.* 2007, 69, 581-586.
- Townsend K. M., Boyce J. D., Chung J. Y., Frost A. J., Adler B.: Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 924-929.
- Townsend K. M., Frost A. J., Lee C. W., Papadimitriou J. M., Dawkins H. J. S.: Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1096-1100.

Adres autora: prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: iwondam@piwet.pulawy.pl